200936－001

体外診断用医薬品
［承認番号　22100AMX02227000］

2009年７月作成（第１版）

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

ヒトパピローマウイルス核酸タイピングキット
（分類コード番号：84048000）

クリニチップ® HPV

全般的な注意

1．本品は、体外診断用医薬品ですので、それ以外の目的には使用できません。
2．測定結果に基づく臨床判断は、臨床症状や他の検査結果などと合わせて担当医師が総合的に行ってください。
3．この添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用方法及び使用目的以外での使用については、測定値の信頼性を保証しかねます。
4．本品を測定する際は、専用の測定装置（ジェネライザー）が必要になりますので、測定する際には測定装置の取扱説明書に記載された使用方法に従って操作を行い、記載された事項をよく読んでから測定を行ってください。
5．試薬が誤って目や口に入った場合や皮膚に付いた場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
6．本品を使用する際は精度管理を実施し、精度が確保されていることを確認してください。
7．本品の測定結果は、試料中のHPV DNAの濃度が極めて低い場合や塩基配列が標準株と異なる場合等において、HPV DNA陰性を示すことがあります。

形状・構造等（キットの構成）

構成試薬名	成　分
LAMP増幅試薬：	
プライマー試薬Ａ	タイプ16、35、59用プライマー
プライマー試薬Ｂ	タイプ18、39、56用プライマー
プライマー試薬Ｃ	タイプ45、68用プライマー
プライマー試薬Ｄ	タイプ51、58用プライマー
プライマー試薬Ｅ	タイプ31、33、52用プライマー
プライマー試薬Ｆ	βグロビン用プライマー
HPV-DNAチップ：	
HPV-DNAチップ	タイプ16プローブ
	タイプ18プローブ
	タイプ31プローブ
	タイプ33プローブ
	タイプ35プローブ
	タイプ39プローブ
	タイプ45プローブ
	タイプ51プローブ
	タイプ52プローブ
	タイプ56プローブ
	タイプ58プローブ
	タイプ59プローブ
	タイプ68プローブ
検出試薬：	
ハイブリ緩衝液	
挿入剤	
希釈液	

使用目的

子宮頸部細胞中の13種高リスクヒトパピローマウイルス（HPV）ゲノムの検出と型判別
（高リスクHPV感染診断の補助に使用される。）

測定原理

1．測定原理

子宮頸部細胞から抽出したDNAを試料として、子宮頸癌のハイリスク因子である13タイプのHPVのDNAを各々タイプ特異的に増幅する13種類のプライマーを用いてLAMP増幅法にて増幅します。前記増幅産物を13タイプHPV各々に特異的な13種類のプローブが基板上に固定してある電流検出型DNAチップに滴下すると、増幅産物中のHPV DNAがプローブとハイブリダイゼーションし２本鎖DNAを形成します。次に挿入剤溶液をDNAチップに添加すると２本鎖を形成したDNAプローブに特異的に挿入剤が結合します。これに電圧をかけると、挿入剤が結合した２本鎖DNAプローブに対応する位置の基板に電流が発生し、その強さを測定することにより検体中に存在する13タイプのHPV DNA各々の有無を検出します。

2．特長

1）HPVタイプ特異的なプライマー及びプローブを使用しているので、特異度が高くHPVタイピングが可能です。
2）LAMP増幅法を使用しているため、高感度でHPVタイピングが可能です。
3）LAMP増幅試薬は試薬がチューブに既に分注されていますので、増幅操作前の試薬調製が簡便です。

操作上の注意

1．検体の性質、検体採取法

1）測定試料
子宮頸部細胞から抽出したDNA

2）検体採取法
子宮頸部細胞診の細胞採取方法と同様に、綿棒またはウレタン棒を用いて子宮頸部の扁平上皮と腺上皮の境界部分付近から子宮頸部細胞を擦り取ります。この綿棒からDNAを抽出します。また、液状細胞診用採取液中の子宮頸部細胞も検体として使用可能です。遠心操作により集めた子宮頸部細胞からDNAを抽出してください。なお、一般に細胞検体を用いるウイルス検査において検査対象部位の細胞を一人の患者より連続して採取する場合、採取部位がほぼ同一であれば同一のウイルス型に感染した細胞が採取されると考えられますが、採取部位が異なれば異なるウイルス型に感染した細胞が採取される可能性があります。

3）DNA抽出及び精製法
DNA抽出及び精製はDNA抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit：QIAGEN社製）を推奨します。当該製品の説明書の操作方法に従って抽出・精製してください。
また、本検出法に適切なDNA量は、0.08ng/チューブ以上です。

4）検体の保存について
子宮頸部細胞を含む綿棒は－20℃以下で保存してください。－20℃以下で１ヵ月は保存できます。また、凍結された子宮頸部細胞を含む綿棒の再凍結は避けてく

ださい。－20℃以下で保存できない場合は、室内温度（15～30℃）保存では当日中、冷蔵（２～８℃）保存では７日以内に測定してください。
液状細胞診用採取液の保存は、当該製品の取扱説明書に従ってください。

２．妨害物質

交差反応性

①以下のウイルス（ウイルス感染価：1×10^{6}TCID$_{50}$/mL）との交差反応性は認められません。
Adenovirus Type 2、Cytomegalovirus、Herpes Simplex Type 1、Herpes Simplex Type 2、Simian Virus 40、Burkitt's Lymphoma（Human herpesvirus 4（EBV））、Hepatitis B Virus

②以下の細菌（細菌数：1×10^{7}菌体/mL）との交差反応性は認められません。
Porphyromonas asaccharolytica deposited as Bacteroides、*Candida albicans*、*Enterobacter cloacae*、*Escherichia coli*、*Gardnerella vaginalis*、*Haemophilus ducreyi*、*Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae type 4*、*Lactobacillus gasseri deposited as Lactobacillus acidophilus*、*Mycoplasma hominis*、*Mycoplasma hyorhinis*、*Neisseria lactamica*、*Clostridium stricklandii*、*Proteus vulgaris*、*Ureaplasma urealyticum*、*Treponema vincentii*、*Acinetobacter genomospecies 13 deposited as Acinetobacter anitratus*、*Fusobacterium nucleatum subsp. animalis*、*Mobiluncus curtisii subsp. holmesii*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Chlamydia trachomatis*、*Trichomonas vaginalis G3*

用法・用量（操作法）

１．試薬の調製方法

１）試薬は調製前に、室内温度（15～30℃）に戻してから以下のように調製してください。

①増幅試薬Ａ～Ｆ：プライマー試薬Ａ～Ｆをそのまま使用します。

②HPV-DNAチップ：HPV-DNAチップをそのまま使用します。

③ハイブリ緩衝液：ハイブリ緩衝液をそのまま使用します。

④挿入剤溶液：挿入剤200μLに対して希釈液40mLの割合で混合して挿入剤溶液として使用します。

２）操作上の注意

①試料及び融解した増幅試薬は氷上で作業を行ってください。

②増幅試薬及びHPV-DNAチップは使用する直前に測定検体数に応じた数だけ室内温度（15～30℃）に戻し、速やかに測定を行い、長時間室内温度（15～30℃）に放置しないでください。

③増幅試薬は一連の６チューブにプライマー試薬Ａ～Ｆ別々に分注されており、１回測定用となっています。測定検体数に応じて包装から取り出して操作を行ってください。残りは指定された貯法で保管してください。

④プライマー試薬Ａ～Ｆを使用する際には、融解後スピンダウンして、チューブの内壁やキャップに付着している試薬をチューブ底に集めてから使用してください。なお、酵素が失活する可能性がありますので、激しい攪拌は避けてください。

３）開封後の試薬の保存方法
開封後、プライマー試薬Ａ～Ｆは、－20℃以下で保存してください。また、室内温度（15～30℃）に戻したプライマー試薬Ａ～Ｆの繰り返しの凍結融解は避けてください。

２．キット以外に必要な材料、試薬及び測定機器

①マイクロピペット（0.5～10μL、10～100μL、50～200μL）
②フィルター付きピペットチップ（ナルジェヌンクインターナショナル社製）
③チューブ冷却用アルミ製ラック
④氷（クラッシュアイス）及びアイスボックス
⑤微量簡易遠心機
⑥８連マイクロチューブ用簡易遠心機
⑦ボルテックスミキサー
⑧ヒートブロック（サーマルサイクラーまたは恒温槽：95℃、80℃、63℃が設定できるもの）
⑨ジェネライザー（Genelyzer：電流検出型チップ測定装置）東芝ホクト電子株式会社製
⑩クリーンベンチ（UV照射が可能なもの：LAMP産物注入時に使用）
⑪廃棄用蓋付きボトル
⑫使用済みチップ廃棄用蓋付きボトル
⑬使い捨て手袋
⑭ハイター／ピューラックス
⑮ジェネライザー装置用ハイブリ洗浄液及びジェネライザー装置用配管洗浄液（別売：製造元　積水メディカル株式会社）

３．測定（操作）法

〈抽出〉

QIAamp DNA Mini Kit：QIAGEN社製を推奨します。

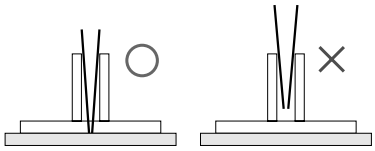
〈増幅〉

１）検体より抽出したDNA溶液を95℃で５分間加温します。加温後直ちに氷上で冷却します。
２）スピンダウンした後、DNA溶液各１μLを各々24μLの増幅試薬の入った６連のチューブに各々加え、１回の転倒またはタッピングにより混合します。
３）スピンダウンした後、63℃で90分間加温します。
４）さらに80℃で５分間加温し、直ちに氷上で冷却し、反応を停止します。

〈検出〉

１）ジェネライザー（Genelyzer：電流検出型チップ測定装置）に挿入剤溶液、ハイブリ洗浄液（別売）、配管洗浄液（別売）を設置します。装置立上げ時に送液チューブ内を試薬に交換する操作を行います。詳細はジェネライザーの取扱説明書を参照してください。
２）スピンダウンした後、６連チューブ各々から10μLずつ分取し、滅菌チューブに混合します。
３）ハイブリ緩衝液６μLを滅菌チューブに加えボルテックスミキサーにより混合します。
４）スピンダウンした後、滅菌チューブから50μL分取してHPV-DNAチップへ全量加えます。HPV-DNAチップへ混合液を加えるときには、以下のことに注意してください。
・マイクロピペットに新しいフィルター付きピペットチップをしっかりと装着させてください。
・ピペッティングはしないでください。

・ピペットチップをHPV-DNAチップの検体注入口から電極基板に当たるまで垂直に挿入してください。



・混合液注入時には気泡がHPV-DNAチップに入らないように注意してください。マイクロピペットのピストンを1段階目まで押し下げて混合液をゆっくり注入し、ピストンを押したまま垂直に引き抜いてください。ピストンを2段階目まで押し下げて混合液を最後まで押し出すと気泡がHPV-DNAチップに入る場合がありますので、避けてください。

5）混合液注入後速やかにHPV-DNAチップをジェネライザー(Genelyzer：電流検出型チップ測定装置)へ挿入し、ジェネライザーの操作手順に従って操作し、電流シグナルの測定を行ってください。

測定結果の判定方法

1．判定方法

1）陽　性：検体の平均電流値と陰性コントロールの平均電流値の差が10nA以上の場合、陽性と判定する。

2）陰　性：検体の平均電流値と陰性コントロールの平均電流値の差が10nA未満の場合、陰性と判定する。

3）再検査：陰性コントロールの平均電流値が45nA以上の場合、または陽性コントロールの平均電流値と陰性コントロールの平均電流値の差が10nA未満の場合、無効と判定する。無効の場合は、増幅操作から再検査してください。再検査してもなお無効と判定された場合は、改めて検体採取を行ってください。

なお、上記の判定はジェネライザー(Genelyzer：電流検出型チップ測定装置)によって自動的に行われます。

臨床的意義

HPVは子宮頸部浸潤癌の99%以上から検出され、13種類のHPV（16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68）が子宮頸癌の高リスク群として分類されており、これら高リスクHPVの持続感染が子宮頸癌の危険因子であることが報告されています。また本邦の研究では高リスクHPVの中でもHPV16、18、31、33、35、52、58型の感染が子宮頸癌の前駆病変であるCINの進展に有意なリスクであることが報告されており、HPVをタイプ別に測定し個別のフォローアップを行うことが効果的であるとの報告もなされています。また、本邦では感染例の報告が少ない45型も前記と同様です。

子宮頸癌検査の感度の観点からは、細胞診に加えHPV-DNAテストを実施することにより感度が向上し、長期的には医療費の軽減につながると考えられています。

本品は、子宮頸部細胞診においてBethesda systemのASC-US以上(日母分類のClassⅢa以上に相当)の所見が認められる患者等のHPVタイピング検査に有用と考えられます。

臨床性能試験では、子宮頸部細胞244例を用いてPCR-ダイレクトシークエンス法を対照法としてHPVタイピング性能を比較検討しました。13種類のHPVタイプ別の一致率は、96.7%～100%と良好でした。本キットは簡便・迅速・高感度にHPVタイピングが可能であり、熟練した技術と長時間を要するPCR-ダイレクトシークエンス法のHPV検査における課題を解決することができることから、子宮頸癌の診断・治療に貢献できるものと考えます。

●臨床性能試験結果

臨床検体244例を用いたHPV検出における対照法(PCR-ダイレクトシークエンス法)と本法との比較

HPVタイプ別の対照法との一致性検討結果は以下のとおりです。

		対照法		計
		＋	－	
本　法	＋	a	b	a ＋ b
	－	c	d	c ＋ d
計		a ＋ c	b ＋ d	a ＋ b ＋ c ＋ d

計算式：陽性一致率　a／(a＋c)×100

陰性一致率　d／(b＋d)×100

PPV　a／(a＋b)×100

NPV　d／(c＋d)×100

全体一致率　(a＋d)／(a＋b＋c＋d)×100

タイプ	陽性一致率	陰性一致率	PPV	NPV	全体一致率
16	100	96.1	83.7	100	96.7
18	75.0	98.7	66.7	99.1	98.0
31	100	99.1	88.9	100	99.2
33	100	99.2	75.0	100	99.2
35	100	97.5	33.3	100	97.5
39	80.0	98.7	57.1	99.6	98.4
45	100	100	100	100	100
51	100	100	100	100	100
52	97.6	99.0	95.3	99.5	98.8
56	93.3	99.1	87.5	99.6	98.8
58	91.7	99.1	91.7	99.1	98.4
59	66.7	100	100	99.6	99.6
68	100	97.9	50.0	100	98.0

本法で陰性であり、PCR-ダイレクトシークエンス法で陽性となったHPVストレインを含む6検体について検討を行った。検体中ウイルスの本法プライマー領域に該当する塩基配列の変異がDNAチップ法で陰性と判定された事に関係すると考えられた検体は1検体であり、他の5検体は検体中のウイルス濃度が各試験法の増幅感度に満たないか、あるいは増幅感度付近であることが原因と考えられた。

性能

1．感度試験：

HPV DNAを含有する管理用パピローマウイルスDNA弱陽性コントロール(各2.5×10^2コピー／μL)を試料として試験するとき、陽性を示す。

2．正確性試験：

1）管理用陰性コントロールを試料として試験するとき陰性を示す。

2）HPV DNAを含有する管理用パピローマウイルスDNA陽性コントロール(各1.0×10^3コピー／μL)及び管理用パピローマウイルスDNA弱陽性コントロール(各2.5×10^2コピー／μL)を試料として各々試験するとき、陽性を示す。

3．同時再現性試験：

管理用陰性コントロール及びHPV DNAを含有する管理用パピローマウイルスDNA陽性コントロール（各1.0×10^3コピー／μL）を試料として各々3回試験するとき、管理用陰性コントロールはすべて陰性を、管理用パピローマウイルスDNA陽性コントロールはすべて陽性を示す。（1．～3.までの試験方法は弊社試験法による。）

4．最小検出感度

2.5×10^2コピー／μL（合成DNAとして）

合成DNAを用いた検討において、本品ではHPV33の検出限界濃度が他の12タイプよりも高いことが分かっています。

5．較正用標準物質

ヒトパピローマウイルス合成DNA（社内標準物質）

使用上又は取扱い上の注意

1．取扱い上（危険防止）の注意

1）検体はHIV、HBV、HCV等の感染の恐れがあるものとして取り扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングを行わないでください。

2）希釈液には防腐剤としてプロクリン300が含まれており、皮膚などを刺激する場合があります。もし、皮膚や衣類についたときは速やかに水で洗い流してください。皮膚に炎症が生じた場合は医師の手当てを受けてください。

2．使用上の注意

1）本品は貯法に従い、プライマー試薬A～F及びHPV-DNAチップは－20℃以下、ハイブリ緩衝液、挿入剤及び希釈液は2～10℃で保存してください。

2）使用期限を過ぎた試薬は、測定値の信頼性を保証しかねますので、使用しないでください。

3）LAMP増幅法は非常に高感度でDNAを増幅するので、他検体の増幅産物等のDNAがごく微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となります。このようなコンタミネーションを回避するため、増幅後からHPV-DNAチップに混合液を加える操作は可能な限りUV照射が可能なクリーンベンチ等を使用してください。さらに、増幅後から検出までの操作は、DNA溶液を増幅試薬に加える部屋とは別の部屋で行ってください。

4）挿入剤溶液を継ぎ足して使用することは避けてください。

5）測定は直射日光を避けて行ってください。

3．廃棄上の注意

1）使用済の検体及び使用した器具などを廃棄する前に0.1%濃度以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸すか、またはオートクレーブ（121℃、20分間）で処理してください。

2）検体又は検体を含む溶液が飛散した場合、感染を防止するため、0.1%濃度以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液等でよく拭き取ってください。

3）試薬、処理した検体及び使用した器具などを廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従い、医療廃棄物又は産業廃棄物などとして処理してください。

4）試薬の廃棄にあたっては、水質汚濁防止法等の規制に留意してください。

4．その他の注意

容器等は他の目的に転用しないでください。

貯法・有効期間

名　称		貯法・有効期間
クリニチップ® HPV	プライマー試薬A	－20℃以下　18ヵ月間
	プライマー試薬B	
	プライマー試薬C	
	プライマー試薬D	
	プライマー試薬E	
	プライマー試薬F	
	HPV-DNAチップ	－20℃以下　1年間
	ハイブリ緩衝液	2～10℃　1年間
	挿入剤	
	希釈液	

（使用期限は外装に記載してあります。）

包装単位

20回用

	名　称		包　装
LAMP増幅試薬	クリニチップ® HPV	プライマー試薬A	各24μL×20本
		プライマー試薬B	
		プライマー試薬C	
		プライマー試薬D	
		プライマー試薬E	
		プライマー試薬F	
HPV-DNAチップ		HPV-DNAチップ	20個
検出試薬		ハイブリ緩衝液	1mL×　1本
		挿入剤	2.5mL×　1本
		希釈液	40mL×10本

本品の構成試薬には別包装があります。弊社までお問い合わせください。

主要文献

1）NEJM 348, 518-527（2003）

2）Int. J. Cancer 119, 2713-2715（2006）

3）CA Cancer J Clin 52, 342-362（2002）

4）沖　明典　第58回日本産科婦人科学会学術講演会　講演要旨（2006）

5）Nucleic Acids Research 28, e63（2000）

6）Clinical Chemistry 50, 658-661（2004）

7）積水メディカル株式会社　社内データ

お問い合わせ先

積水メディカル株式会社　学術担当

電話番号　0120-249-977

FAX番号　0120-247-477

製造販売元　積水メディカル株式会社

東京都中央区日本橋三丁目13番5号